

ラット摘出心の虚血再灌流障害に対する ANP の抑制効果についての検討

光 島 隆 二 安 倍 十三夫

札幌医科大学医学部外科学第二講座 (主任 安倍十三夫 教授)

Effects of ANP for Myocardial Protection on Ischemic and Reperfusion Injury in Isolated Rat Hearts

Ryuji KOSHIMA, Tomio ABE.

*Second Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine
(Chief : Prof. T. ABE)*

ABSTRACT Several reports have shown that the Atrial natriuretic peptide (ANP) protects the myocardium from ischemic and reperfusion injury. Since these studies were performed via the regional ischemia model, it is unclear whether the effect of ANP on the ischemic myocardium is a secondary effect by way of improved subendocardial blood flow or is due to some other direct effect of ANP. The present study aims to show that ANP has a direct cardioprotective effect in a global ischemia model of isolated rat heart.

The constant flow perfusion method was performed using the Langendorff apparatus. Rat hearts were exposed to global ischemia for 30 min followed by reperfusion for 40 min. Left ventricular performance, myocardial energy status, release of creatine kinase and tissue water content were measured after reperfusion. Ultrastructural study was performed in four groups (n=5). Group C consisted of untreated normal rat hearts which underwent pre- and postischemia in Krebs Henseleit bicarbonate buffer (KHB) solution. Groups H1, H2 and H3 were all treated with a KHB+ANP 100 nmol/l solution during preischemic, postischemic and pre- and postischemic periods respectively.

The hearts from the H3 group demonstrated the best myocardial protection on ischemic and reperfusion injury among the 3 treated groups. The recovery of cardiac function and the reduction of ischemic tissue damage in the H1 group were significantly better than in the C group. However there was no significant difference in the myocardial damage between the C and H2 groups, the recovery of cardiac function in the H2 group was significantly better than in the C group.

The present study shows that treatment with ANP during pre- and postischemia appears to be effective in preventing ischemic and reperfusion injury through direct myocardial protection. These data indicate that the treatment with ANP during preischemic period protects the myocardium from irreversible ischemic damage and the treatment with ANP during postischemic period prevents the occurrence of the myocardial stunnig after reperfusion.

(Received December 22, 1999 and accepted January 12, 2000)

Key words : Atrial natriuretic peptide (ANP), Global ischemia, Ischemic and reperfusion injury, Isolated rat heart

1 結 言

開心術における心筋を虚血再灌流障害から保護する心筋保護法は、心臓手術において必要不可欠な手術手技法である。心筋保護液は、虚血心筋障害から心筋を保護するために種々の工夫が行われ使用されている。最近、より効果的な心筋保護を得るため、心筋保護液中に亜硝酸剤を添加する方法が行われている^{1,2)}。亜硝酸剤は Nitric oxide (NO) donor であり、細胞内の cGMP を増加させることが報告されているが³⁾、この作用は虚血再灌流障害から心筋を保護する効果を有するとされる⁴⁾。

1981 年に de Bold ら⁵⁾ によって報告された心房性 Na 利尿ペプチド (atrial natriuretic peptide: ANP) は、主として心房で合成されるホルモンであるが、亜硝酸剤は soluble guanylate cyclase を介して cGMP を増加させているのに対し³⁾、ANP は particulate guanylate cyclase を介して cGMP を増加させる⁶⁾。このような機序の違いがあるものの、ANP は亜硝酸剤と同様に細胞内の cGMP を増加させる作用を有するので、心筋保護液への ANP の添加で心筋保護効果が得られることが予想される。

現在まで、心臓の冠状動脈を結紮することによる局所虚血モデルの検討で、ANP 投与が虚血再灌流障害を抑制することが報告されている^{7,8)}。しかし ANP が冠状動脈の拡張作用を有することから⁹⁾、局所虚血モデルを用いた場合、ANP が虚血領域への微細側副血行路を増加させて、虚血に曝される領域を減少させたことにより、再灌流障害抑制効果を得られた可能性を否定できない。心筋保護液の投与法は、全虚血心筋に対して行われるため、このような側副血行による二次的効果を排除した条件で、ANP が心臓全体の虚血再灌流障害に対して効果を有することを明確にする必要がある。本研究では、われわれは心臓の全虚血モデルを用いることにより、ANP が心臓の虚血再灌流障害に対して直接的効果を有するか否かを検討した。

2 実験方法

2.1 実験動物

日本エスエルシー株式会社に生産された体重 270 g から 340 g までの近交系 Wistar King Aptekman (WKA) 雄ラットを用いた。動物の取り扱いには札幌医科大学動物実験指針に従った。

2.2 灌流装置 (Fig. 1)

WKA 雄ラットの摘出心を Modified Krebs Hen-

seleit bicarbonate buffer (KHB) 液 (Table 1) を灌流液とした Langendorff 灌流装置 (UPH-L: UNIQUE MEDICAL 社) に装着した。回路内にローラーポンプ (テルフュージョン BP-101: TERUMO 社) を装着し定流量灌流とした。灌流中は、KHB 液を 95%O₂ と 5%CO₂ にて平衡化し 37°C に保温した。尚、冠状静脈洞より流出する灌流液はすべて破棄した。

2.3 摘出心の作製

WKA 雄ラットにペントバルビタール 40 mg/kg を腹腔内注入し、麻酔を行った。腹部正中切開を行い、ヘパリン 400 単位を下大静脈より投与した後、開胸下に心臓を迅速に摘出した。摘出心を直ちに 4°C の生理食塩水に浸し心停止を得た後、摘出心の大動脈にカニューラを挿入し灌流装置に装着した。

2.4 ANP

ANP は、サントリー株式会社より提供された「カルペリチド」を注射用水で溶解し、使用した。

2.5 実験群

実験群は ANP の投与時期を変えることにより 4 群に分類した (Fig. 2)。すなわち、

1. control 群 (C 群): ANP 非投与の虚血群 (N = 5)
2. H 1 群: 虚血前のみ ANP を投与する群 (N = 5)
3. H 2 群: 虚血後のみ ANP を投与する群 (N = 5)

Fig. 1 Diagram of perfusion circuits.

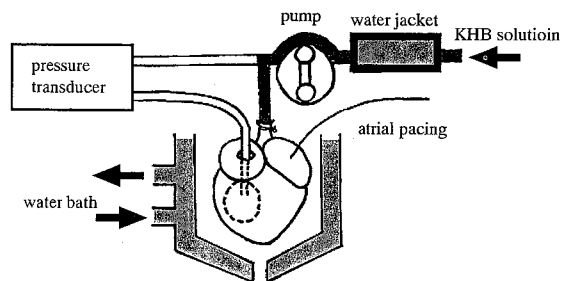
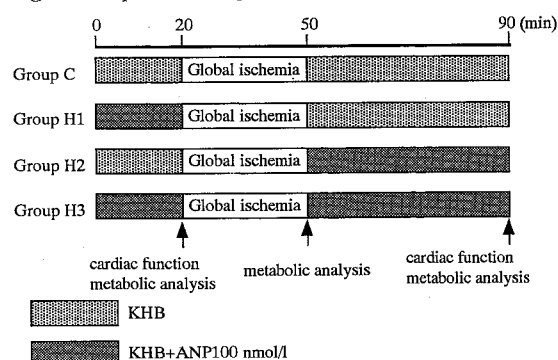


Table 1 Composition of modified Krebs Henseleit bicarbonate (KHB) buffer solution

NaCl	118 m mol/l
NaHCO ₃	25 m mol/l
KCl	4.6 m mol/l
KH ₂ PO ₄	1.2 m mol/l
MgSO ₄	1.2 m mol/l
CaCl ₂	2.8 m mol/l
EDTA-2Na	0.5 m mol/l
Glucose	11.1 m mol/l

Fig. 2 Experimental protocol and groups.



4. H 3 群: 虚血前と虚血後に ANP を投与する群 (N = 5)

とした。

ANP の投与濃度は諸家の報告^{7,10-13)} に準じて 100 nmol/l とした。

2.6 実験方法

摘出心を灌流装置に装着後に 10 ml/分の定量冠灌流を開始し、付属のペースングユニットで毎分 300 回の心房ペースングを行った。摘出心を 37°C、20 分間灌流した時点で、虚血前的心機能を測定した。次いで、摘出心を 37°C、30 分間の常温全虚血とした後に 37°C、40 分間の再灌流を行い、虚血再灌流後の心機能を測定した。灌流実験後、摘出心を短軸面横断し二分割した。乾ガーゼで摘出心に付着した水分を除去した後、液体窒素により冷却した Wollenberger 鉗子を用いて、瞬時に摘出心を圧挫凍結した。さらに、凍結した摘出心をアルミ箔にて被覆し、液体窒素中に保存した。二分割した摘出心のうち、心基部側を心筋水分含量の測定に、心尖部側を高エネルギーリン酸化合物の測定に用いた。また、ANP 投与群と非投与群との虚血前および虚血中の高エネルギーリン酸化合物の変化を測定するために、上記の実験群とは別の WKA ラットを用いて虚血前および再灌流直前に高エネルギーリン酸化合物の測定を行った (各群 N = 5)。

2.7 心機能の測定

摘出心の左心室内に、ラテックスバルーン (LB-4: UNIQUE MEDICAL 社) を経左房的に挿入した。このバルーンに生理的食塩水を注入し、baselineにおいて心室拡張末期圧 (Left ventricular end-diastolic pressure: LVEDP) が 0 mmHg となるバルーン容量を設定し、さらにこれに加え 10 μ l ごとに 40 μ l までバルーン容量を増量し、各左室容量における摘出心の心

機能を測定した。同時に、大動脈に挿入したカニューレの側枝より灌流圧を測定した。圧測定は、カテーテル血圧測定用トランスデューサー (Model59-DTS-H: American Edwards) を介して得られた変換信号を増幅器 (CM-800: フクダ電子) で処理した後、熱ペン式記録紙 (RF-85A: フクダ電子) で記録して行った。測定項目は left ventricular developed pressure (LVDP), peak positive dP/dt (+dP/dt), peak negative dP/dt (-dP/dt), left ventricular diastolic compliance (LVDC) とした。LVDP は収縮末期圧から拡張末期圧を減じたものとし、LVDC は、各バルーン容量に対する左室拡張末期圧の関係から left ventricular end-diastolic pressure volume relationship (EDPVR) を求め、それより得られる slope の逆数として計算した¹⁴⁾。

2.8 心筋逸脱酵素 creatine kinase (CK) 濃度の測定

虚血直前、虚血再灌流直後の 10 分間に冠状静脈洞より流出する灌流液を採取し、CK 濃度を測定した。

2.9 心筋水分含量の測定

心基部側の凍結組織片の湿重量を測定後、凍結真空乾燥装置 (Ulvac DF-01H: 日本真空技術社) 内で 48 時間以上乾燥させ、再度秤量した値を乾燥重量とした。心筋水分含量は、(湿重量 - 乾燥重量) / (乾燥重量) ml/g dry weight として算出した。

2.10 心筋内高エネルギーリン酸化合物の測定

心尖部側の凍結組織片の湿重量を秤量した後、0°C の低温下で 0.5 N の過塩素酸 1 ml を加え、homogenizer (Kinematica Polytron) にて 1 分間磨細した。次いで、3000 rpm の遠心沈殿を 20 分間行って上清を取り分けた後、沈渣に再び過塩素酸 0.5 ml を加えた。同様に遠心を行い、得られた上清を最初の上清に加えた。この上清を、3 N KOH および 1 N KOH で pH meter F-8 (Horiba) により、pH7.0 に滴定中和した。再び 3000 rpm の遠心沈殿を 20 分間行い、得られた上清の容量を測定し、これを試料とした。この試料を、高速液体クロマトグラフィー (HPLC: 日本分光) により定量分析し、adenosine triphosphate (ATP), adenosine diphosphate (ADP), adenosine monophosphate (AMP) を測定した。測定値は、乾燥重量 1 g あたりの含量 (μ mol/g dry tissue weight) として示した。心筋内のエネルギー量の指標である energy charge (EC)¹⁵⁾ を、 $(2 \text{ ATP} + \text{ADP}) / 2 (\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$ の式から算出した。

2.11 電子顕微鏡による形態学的検討

細胞内微細構造物の変化を検討するため、心拍動下

に左室前壁の組織を採取し、3%グルタルアルデヒドと1%オスニウム酸で固定後に Quetol 812 にて包埋した。次いで、超薄切片を作製し、酢酸ウラニール・クエン酸鉛重染色を行い電子顕微鏡的に観察した。

2・12 統計処理

各数値は、平均値±標準偏差で示した。各指標について分散分析を行い、有意な差が検出された場合には、Fisher の PLSD 法を用いて群間比較を行った。P < 0.05 を有意とした。心機能に関する測定値では虚血前値に対する虚血再灌流後値の回復率を計算し、百分率(%)で表示した。

3 実験成績

各群間の、実験で使用したラットの体重に有意差はなかった。また、虚血前における心機能、心筋内高エネルギーリン酸化化合物などの指標は、各群間に有意な差を認めなかった。また虚血前の灌流圧 (mmHg) は C 群 65.6±7.02, H 1 群 64.0±6.96, H 2 群 60.8±3.63, H 3 群 64.2±5.68 であり、各群間に有意差はなかった。虚血後の灌流圧は C 群 123.2±4.44, H 1 群 111.8±17.07, H 2 群 105.6±10.50, H 3 群 93.2±

15.52 であり、H 3 群は C 群と H 1 群に対して、H 2 群は C 群に対して有意に低値であった。

3・1 心機能

各群における左室容積 40 μ l での LVDP の回復率は C 群 19.52±13.92%, H 1 群 57.32±14.02%, H 2 群 39.48±12.33%, H 3 群 77.76±3.28% であった。+dP/dt の回復率は C 群 18.80±12.29%, H 1 群 56.96±16.14%, H 2 群 37.78±13.36%, H 3 群 77.50±4.31%, -dP/dt 値の回復率は C 群 17.34±13.28%, H 1 群 54.68±14.54%, H 2 群 34.98±14.12%, H 3 群 73.90±4.37% であり、H 1～3 群は対象群に比して回復が良好であったが、その中で、H 3, H 1, H 2 群の順で有意に良好であった (Table 2)。LVDC の回復率は C 群 22.26±3.91%, H 1 群 33.70±10.11%, H 2 群 25.56±13.22%, H 3 群 39.30±10.10% であり、H 3 群は、C 群と H 2 群に比べ有意に LVDC の回復率が良好であった (Fig. 3)。

3・2 心筋 CK 濃度 (Table 3)

虚血直前の 10 分間に、冠状静脈洞より流出する灌流液中の CK 濃度は、各群間に有意な差は認めなかったが、虚血再灌流直後では C 群 246.8±46.07 IU/l, H1

Table 2 Postischemic recovery of left ventricular function (%)

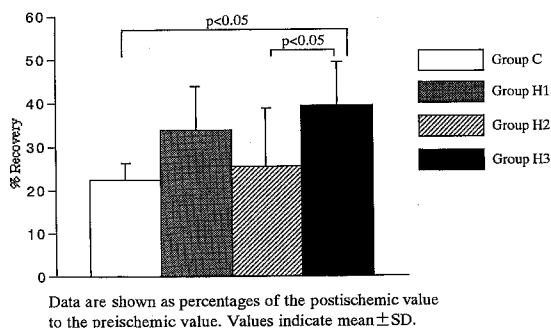
	baseline (%)	10 μ l (%)	20 μ l (%)	30 μ l (%)	40 μ l (%)
LVDP					
Group C	19.44±14.03	20.20±13.15	18.64±11.92	19.18±13.34	19.52±13.92
Group H1	60.96±16.65 ^{a,c}	60.04±15.24 ^{a,c}	58.42±14.35 ^{a,c}	57.94±13.52 ^{a,c}	57.32±14.02 ^{a,c}
Group H2	28.14±13.79	37.08±12.90 ^a	38.78±12.73 ^a	38.34±12.11 ^a	39.48±12.33 ^a
Group H3	85.88±7.33 ^{a,b,c}	83.58±5.11 ^{a,b,c}	77.98±7.12 ^{a,b,c}	79.68±1.77 ^{a,b,c}	77.76±3.28 ^{a,b,c}
+dP/dt					
Group C	18.86±10.95	19.02±11.18	18.46±10.78	18.56±11.54	18.80±12.29
Group H1	59.62±18.67 ^{a,c}	58.44±17.61 ^{a,c}	57.86±16.84 ^{a,c}	57.86±17.01 ^{a,c}	56.96±16.14 ^{a,c}
Group H2	29.36±11.44	37.06±13.80 ^a	37.62±13.40 ^a	37.00±13.15 ^a	37.78±13.36 ^a
Group H3	84.08±7.89 ^{a,b,c}	82.50±7.92 ^{a,b,c}	79.14±4.12 ^{a,b,c}	78.26±3.65 ^{a,b,c}	77.50±4.31 ^{a,b,c}
-dP/dt					
Group C	16.00±11.95	17.02±12.38	16.38±11.98	16.44±12.71	17.34±13.28
Group H1	57.50±16.66 ^{a,c}	55.38±14.64 ^{a,c}	55.08±13.80 ^{a,c}	55.32±14.18 ^{a,c}	54.68±14.54 ^{a,c}
Group H2	26.50±11.99	35.56±14.19 ^a	35.08±13.64 ^a	35.04±13.12 ^a	34.98±14.12 ^a
Group H3	79.66±3.67 ^{a,b,c}	78.50±4.96 ^{a,b,c}	76.30±2.94 ^{a,b,c}	73.50±3.17 ^{a,b,c}	73.90±4.37 ^{a,b,c}

Data are shown as percentages of the postischemic value to the preischemic value. Values indicate mean±SD. LVDP: left ventricular developed pressure, +dP/dt: peak positive dP/dt, -dP/dt: peak negative dP/dt.

^ap<0.05 vs Group C

^bp<0.05 vs Group H1

^cp<0.05 vs Group H2

Fig. 3 Percent recovery of left ventricular diastolic compliance

群 190.8 ± 35.05 IU/l, H2 群 215.2 ± 28.78 IU/l, H3 群 151.0 ± 24.76 IU/l であり, H3 群が, C 群と H2 群に対して, H1 群は C 群に対して有意に CK 濃度が低値であった。

3.3 心筋水分含量 (Fig. 4)

心筋水分含量 (ml/g dry weight) は C 群 5.04 ± 0.39 , H1 群 4.76 ± 0.24 , H2 群 4.93 ± 0.17 , H3 群 4.57 ± 0.35 であり, H3 群が, C 群に対し有意に低値であった。

3.4 心筋内高エネルギーリン酸化合物 (Table 4)

虚血中における AMP, ADP, ATP, EC (μ mol/g dry tissue weight) は, 各群間に有意な差は認めなかった。虚血再灌流後では, AMP は C 群 3.42 ± 1.38 , H1 群 3.58 ± 0.42 , H2 群 3.69 ± 0.56 , H3 群 3.09 ± 0.50 であり, 各群間に有意な差は認めなかった。ADP は C 群 2.96 ± 1.32 , H1 群 4.01 ± 0.29 , H2 群 3.64 ± 0.48 , H3 群 3.98 ± 0.25 であり, H1 群と H3 群が, C 群と比較して有意に高値であった。ATP は C 群 1.78 ± 0.94 , H1 群 3.10 ± 0.34 , H2 群 2.18 ± 0.43 , H3 群 3.48 ± 0.65 であり, H3 群が, C 群と比較して有意に高値であった。EC は C 群 0.39 ± 0.07 , H1 群 0.48 ± 0.03 , H2 群 0.42 ± 0.04 , H3 群 0.52 ± 0.05 であり, H3 群が C 群と H2 群に対し, H1 群が C 群に対して有意に高値であった。

3.5 心筋電子顕微鏡像 (Fig. 5)

心内膜側の電子顕微鏡像は, C 群, H2 群で筋原繊維の断列, 溶解など著明な細胞内構造物の破壊を認めたが, H3 群では他群に比べ良好に保たれていた (Fig. 5 a~d)。心筋細胞内構築の形態をさらに詳しく観察すると, C 群, H2 群ではミトコンドリアの破壊, クリスタ (cristae) の溶解像, マトリックスの明瞭化, Z bands 幅の拡大や屈曲が著明であった。H1 群, H3

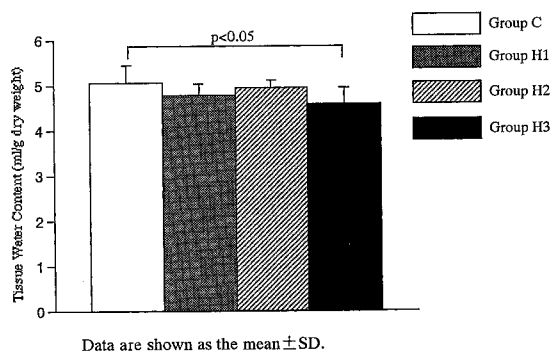
Table 3 Creatine kinase (CK) concentration (IU/l)

(preischemia)	
Group C	17.4 \pm 3.85
Group H1	16.6 \pm 4.51
Group H2	16.8 \pm 5.40
Group H3	13.4 \pm 1.67
(postischemia)	
Group C	246.8 \pm 46.07
Group H1	190.8 \pm 35.05 ^a
Group H2	215.2 \pm 28.78
Group H3	151.0 \pm 24.76 ^{a,b}

Data are shown as the mean \pm SD.

^ap<0.05 vs Group C

^bp<0.05 vs Group H2

Fig. 4 Tissue water content

群はミトコンドリアの腫大, クリスタの溶解像などを認めるものの, C 群, H2 群と比較してその障害程度はより軽度であった (Fig. 5 e~h)。

4 考 察

ANP の心筋保護効果について, 局所の心筋虚血に対しては, 側副血行路の血管を拡張させ, 虚血領域を減少させることによる, 二次的な効果との報告があるが²⁸⁾, 全心筋虚血障害が生じた心筋に対する本剤の効果に関する報告は見当たらない。今回われわれは, 全心筋虚血モデルを用いて本剤が直接的な心筋保護効果を有するか否かについて検討した。また, ANP の冠拡張作用による冠血流量増加が, 心機能や心筋内高エネルギーリン酸化合物量に対して影響を与えるため, 本実験は定圧灌流ではなく定量灌流で検討を行った。今回の実験では, 虚血再灌流後における心機能の回復, 心筋細胞の障害程度, また, 心筋内高エネルギーリン酸化合物量に対して, ANP 投与群 (H3 群) は, 非投与群 (C

Table 4 Adenine nucleotide metabolism($\mu\text{mol/g}$ dry weight)

	AMP	ADP	ATP	energy charge
(preischemia)				
Group C	7.49 ± 1.25	9.42 ± 0.53	7.48 ± 1.70	0.50 ± 0.06
Group H1	6.40 ± 1.35	9.16 ± 0.71	8.28 ± 1.85	0.54 ± 0.06
Group H2	7.49 ± 1.25	9.42 ± 0.53	7.48 ± 1.70	0.50 ± 0.06
Group H3	6.40 ± 1.35	9.16 ± 0.71	8.28 ± 1.85	0.54 ± 0.06
(30min ischemia)				
Group C	9.46 ± 0.75^a	3.24 ± 0.92^a	2.13 ± 0.51^a	0.25 ± 0.04^a
Group H1	7.95 ± 1.33^b	3.90 ± 1.13^b	2.62 ± 0.62^b	0.31 ± 0.07^b
Group H2	9.46 ± 0.75^c	3.24 ± 0.92^c	2.13 ± 0.51^c	0.25 ± 0.04^c
Group H3	7.95 ± 1.33^d	3.90 ± 1.13^d	2.62 ± 0.62^d	0.31 ± 0.07^d
(postischemia)				
Group C	3.42 ± 1.38^a	2.96 ± 1.32^a	1.78 ± 0.94^a	0.39 ± 0.07^a
Group H1	3.58 ± 0.42^b	$4.01 \pm 0.29^{b,e}$	3.10 ± 0.34^b	0.48 ± 0.03^e
Group H2	3.69 ± 0.56^c	3.64 ± 0.48^c	2.18 ± 0.43^c	0.42 ± 0.04^c
Group H3	3.09 ± 0.50^d	$3.98 \pm 0.25^{d,e}$	$3.48 \pm 0.65^{d,e}$	$0.52 \pm 0.05^{e,f}$

Data are shown as the mean SD. AMP: adenine monophosphate, ADP: adenine diphosphate, ATP: adenine triphosphate, energy charge = $(2\text{ATP} + \text{ADP}) / (2\text{ATP} + \text{ADP} + \text{AMP})$

^a $p < 0.05$ vs preischemia Group C

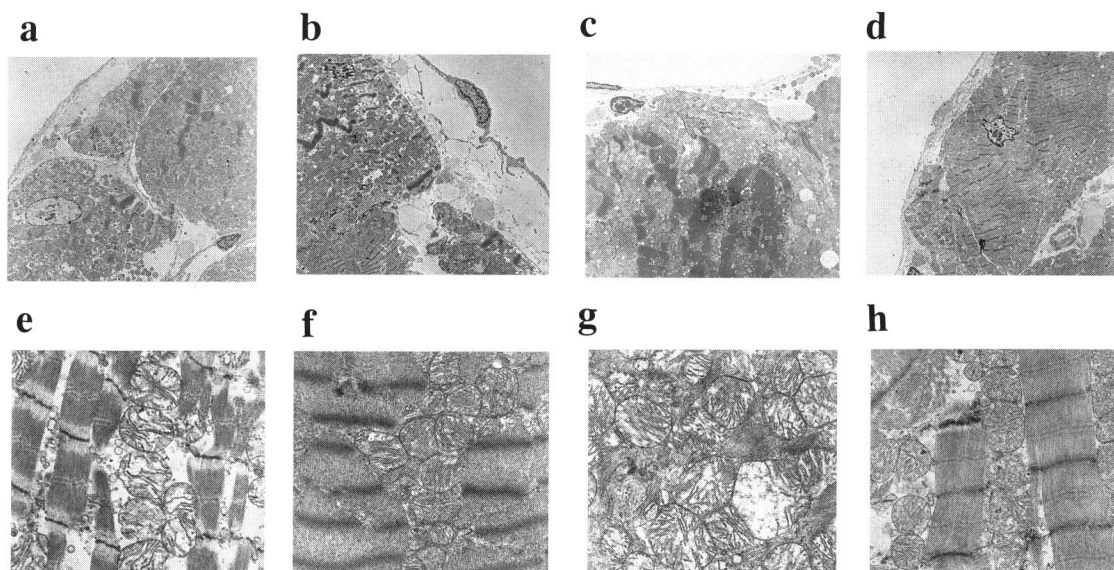
^b $p < 0.05$ vs preischemia Group H1

^c $p < 0.05$ vs preischemia Group H2

^d $p < 0.05$ vs preischemia Group H3

^e $p < 0.05$ vs postischemia Group C

^f $p < 0.05$ vs postischemia Group H2

Fig. 5 Myocardial ultrastructures after 40minutes postischemic recovery

a: Group C, b: Group H1, c: Group H2, d: Group H3.(Original magnifications $\times 3750$)

e: Group C, f: Group H1, g: Group H2, h: Group H3.(Original magnifications $\times 25000$)

群)と比較して有意に良好であったことから、ANP が虚血心筋に対して、冠状動脈拡張による二次的な保護効果ではなく、直接的な保護効果を有することが示された。

本実験において、ANP 投与群 (H 3 群) は心機能回復について良好な結果を認めたが、犬の開胸心における局所虚血モデルで検討した Takata ら⁸⁾の報告では、ANP 投与による心機能の回復効果は認めなかったとしている。しかし、局所虚血モデルは、心臓全体に対する虚血領域の割合と程度により、心機能の低下を認めない場合や低下が軽度であったりするため、心機能の回復効果における局所虚血モデルを、そのまま全虚血モデルに当てはめることは妥当ではないと考える。また、再灌流後の CK 濃度は、ANP 投与群は非投与群と比べて有意に低値であり、虚血再灌流傷害からの心筋細胞障害が軽減されたことが考えられる。ラット摘出肝モデルにおいて検討した Bilzer ら¹⁰⁾は、ANP 投与群は、非投与群と比較して肝細胞逸脱酵素の濃度が有意に低値であったとし、ラット摘出心の局所虚血モデルにおいて検討した Linz ら⁷⁾の報告も、われわれの結果と同様に、ANP 投与群は、非投与群と比べて CK 濃度は低値であり、ANP 投与により心筋細胞障害が軽減されたと述べている。さらに、本実験では、心筋超微細構造の観察で、心筋細胞内構築物の傷害抑制や、心筋水分含有量の増加抑制からも、ANP 投与により虚血再灌流傷害からの心筋障害が軽減されていることが示された。ANP 投与による心筋内高エネルギーリン酸化合物の温存効果については、Linz ら⁷⁾、Takata ら⁸⁾は局所虚血モデルの検討において、ANP 投与群では、非投与群と比較して有意に虚血再灌流後の心筋内 ATP 量が温存されたと報告している。Takata らは ANP 投与による心筋内 ATP 温存効果の機序について、1) ANP 投与によって虚血領域への側副血行が促進され、この領域での心筋ミトコンドリアの虚血傷害が軽減された結果、ミトコンドリアの ATP 産生機能が温存された、2) ANP が cGMP を介して虚血中および再灌流時の心筋細胞内 Ca^{++} 過負荷を軽減したため、細胞内 Ca^{++} 排出に消費される ATP が節約され、さらに Ca^{++} 過負荷によるミトコンドリアの機能傷害が軽減されて、ATP 産生機能が温存されたと推測している。本実験では、ANP 投与群は、非投与群と比較して虚血中の心筋内 ATP 量と EC に有意な差を認めないが、ANP 投与群で再灌流後の心筋内 ATP 量と EC が有意に回復していることから、ANP 投与による心筋内 ATP 温存効果の機序は、再灌流時の細胞内 Ca^{++} 過負荷を軽減し

たことによる ATP 消費の節約と、ミトコンドリアの ATP 産生機能の温存によるものと推測される。

また、虚血再灌流障害に対する ANP の保護効果について、虚血前のみ (H 1 群)、虚血後のみ (H 2 群) 虚血前後 (H 3 群) の 3 時期で検討した。心機能 (LVDP, $\pm \text{dP/dt}$) の回復効果は、虚血前後に投与した群、虚血前のみ投与した群、虚血後のみ投与した群の順で、非投与群に比して有意に良好であった。再灌流後の CK 値は、虚血前のみ投与した群と虚血前後に投与した群が、非投与群と比較して有意に低値であり、心筋超微細構造の観察でも、虚血前のみ投与した群と虚血前後に投与した群は、虚血後のみ投与した群と非投与群と比較して形態的な障害の軽減を認め、ANP を虚血後に投与するよりも虚血前に投与することが効果的であると証明された。Bilzer ら¹⁰⁾の報告でも、虚血再灌流後の肝機能低下や肝細胞傷害を抑制するためには、虚血前に ANP を投与することが効果的であったと報告している。しかし、彼らの報告では、ANP を虚血後に投与した群は、非投与群と比較して肝機能の有意な改善は認めなかったと述べているが、本実験では、ANP を虚血後のみ投与した群は、非投与群と比較して有意に心機能の改善を認めている。これは虚血後投与により、虚血再灌流障害の 1 つである可逆的な一過性の機能障害、いわゆる stunning¹⁷⁾を軽減したことを示唆するものであり、このような効果が、ANP の虚血再灌流傷害に対する心機能回復効果と、肝機能回復効果との差異と考えられる。以上の結果より、ANP の虚血前投与は、細胞壊死といった非可逆的細胞障害を軽減し、虚血後投与は、細胞壊死を抑制しないが、stunning といった可逆的心筋機能障害を軽減する効果を有し、虚血前および虚血後の ANP の併用は、この両者の効果により相加的に虚血再灌流後の機能障害を軽減したと考えられる。また、虚血再灌流後の心機能評価における鋭敏な指標とされる compliance^{14,18)}や、compliance の低下や心筋細胞の機能低下の要因となる¹⁸⁾心筋水分含有量の増加抑制は、ANP を虚血前後に投与した群のみが、非投与群に対して有意に良好であったことから、我々は、心臓における虚血再灌流障害の抑制に ANP を虚血前後に投与することは最も効果的であると結論した。

今回の実験結果から、ANP 投与により心機能が良好に回復した機序としては、心筋細胞自体の障害抑制や心筋内高エネルギーリン酸化合物の温存によるものが考えられる。心筋内の ATP 量は、ATP 産生と ATP 消費のバランスを反映したものであり、必ずしも細胞

内 ATP 量が心機能を反映するとは限らないとされるが¹⁹⁾、心筋細胞内における ATP の消費は、心収縮以外にも細胞内外のイオンバランスや基礎代謝などの細胞内恒常性維持のエネルギー源として消費されるため²⁰⁾、虚血再灌流障害によって細胞内の恒常性維持が保たれなくなると、細胞内浮腫や、解糖系やミトコンドリアのエネルギー産生系、筋小胞体の機能、収縮蛋白といった細胞内収縮機構に障害が起こり、心収縮力や心筋細胞に障害が起こる^{19,21,22)}。つまり、心筋内の ATP の回復は、心収縮と細胞内の恒常性維持に必要不可欠であり、細胞の viability を左右するものである²⁰⁾。しかし、本実験では、器質的障害の抑制程度と心機能の回復程度には明かな関連を示さなかった。また、虚血再灌流後の心機能の回復程度が、虚血中の心筋内 ATP 量に依存するとの報告があるが²³⁾、虚血中の心筋内 ATP 量においても各群間に差を認めず、再灌流後の心筋内 ATP 量にも心機能の回復程度との関連は認められなかった。虚血再灌流障害による心機能低下が軽減された要因としては、収縮機構（ミトコンドリア、筋小胞体、収縮蛋白、細胞内 Ca^{++} 濃度など）の温存^{19,21,22)}と、このような機構への障害を助長する、虚血再灌流時の細胞内 Ca^{++} overload の軽減などが考えられる²⁴⁾。現在、虚血心筋細胞についての検討はなされていないものの、ANP には細胞内 Ca^{++} 濃度の低下作用を有し^{11,13)}、さらには、虚血再灌流障害抑制機序の 1 つとされる²⁵⁾、ATP 依存性 K チャンネルを活性化作用を有することが報告され²⁶⁾、このような作用が ANP の虚血再灌流障害抑制効果の機序であると考えられ、今後、虚血心筋細胞における検討が必要と思われる。

以上より、ANP は心臓の虚血再灌流障害に対し、直接的な抑制効果を有することが示された。しかし、抑制効果の機序は未だ不明な点が多く、今後さらなる検討が必要である。また ANP の投与方法として、虚血前後投与が最も効果的であったことは、ANP を心筋保護液に添加することのみならず、体循環への投与により、さらなる虚血再灌流障害抑制効果が期待できると考えられる。

5 結 語

1. ラット摘出心の全虚血モデルにおいて、ANP の直接的な虚血再灌流障害抑制効果について検討した。
2. ANP 投与により、心機能の回復、心筋内高エネルギーリン酸化化合物の温存、形態学的障害の軽減が認められた。
3. ANP の虚血前投与は非可逆的細胞障害を軽減し、

虚血後投与は可逆的心筋機能障害を軽減する効果を有し、虚血前後投与においては、これらの効果が相加的に心筋障害を軽減したと考えられた。

4. 虚血再灌流障害抑制効果に対する ANP の作用機序は未だ不明な点が多く、今後更なる検討が必要である。
5. 心臓手術時において、ANP を心筋保護液に添加することのみならず、体循環への投与により、さらなる虚血再灌流障害抑制効果が期待できると考えられた。

謝 辞

稿を終えるに当たり、研究に際し御助言、御協力いただいた酪農学園大学獣医解剖学講座竹花助教授、植田講師、並びに教室員各位、お世話になった動物実験施設部の各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

1. Landymore R, Colvin S, Isom W, Culliford A. The effect of nitroglycerin cardioplegia on myocardial cooling in patients undergoing myocardial revascularization. *Ann Thorac Surg* 1983, 35: 621-625.
2. McKeown PP, McClelland JS, Bone DK, Jones EL, Kaplan JA, Lutz JF, Hatcher CR Jr, Guyton RA. Nitroglycerin as an adjunct to hypothermic hyperkalemic cardioplegia. *Circulation* 1983, 68(3Pt. 2): II107-111.
3. Waldman SA, Murad F. Biochemical mechanisms underlying vascular smooth muscle relaxation: the guanylate cyclase-cyclic GMP system. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988, 12(Suppl. 5): S115-118.
4. Ali IS, Gandhi M, Finegan BA, Koshal A, Clanachan AS. Cardioprotection by activation of NO/cGMP pathway after cardioplegic arrest and 8-hour storage. *Ann Thorac Surg* 1998, 65: 1303-1309.
5. de Bold AJ, Borenstein HB, Veress AT, Sonnenberg H. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rat. *Life Sci* 1981, 28: 89-94.
6. Waldman SA, Rapoport RM, Murad F. Atrial natriuretic factor selectively activates particulate guanylate cyclase and elevates cyclic GMP in rat tissues. *J Biol Chem* 1984, 259: 14332-14334.
7. Linz W, Scholkens BA, Albus U, Petry P, Breipohl G, Knolle J. Atrial natriuretic factor

- protects the isolated working ischaemic rat heart against the action angiotensin II. *J Hypertens* 1988, 6 (Suppl.4): S339-S341.
8. Takata Y, Hirayama Y, Kiyomi S, Ogawa T, Iga K, Ishii T, Nagai Y, Ibukiyama C. The beneficial effects of atrial natriuretic peptide on arrhythmias and myocardial high-energy phosphates after reperfusion. *Cardiovasc Res* 1996, 32: 286-293.
 9. Hutter JF. Action of synthetic atrial natriuretic factor on contractility and coronary perfusion in isolated working rat hearts. *Eur J Pharmacol* 1991, 193: 127-129.
 10. 日高寿範, 相坂一雄, 猪股則夫, 古谷真優美, 井上照好, 小俣 貢, 吉田真己, 宮崎朋子, 大野知親, 石原高文. Carperitide (α -human atrial natriuretic peptide) の循環器系に対する作用. *日薬理誌* 1993, 101: 309-325.
 11. Tohse N, Nakaya H, Takeda Y, Kanno M. Cyclic GMP-mediated inhibition of L-type Ca^{2+} channel activity by human natriuretic peptide in rabbit heart cells. *Br J Pharmacol* 1995, 114: 1076-1082.
 12. Yamamoto K, Ikeda U, Shimada K. Natriuretic peptides modulate nitric oxide synthesis in cytokine-stimulated cardiac myocytes. *J Mol Cell Cardiol* 1997, 29: 2375-2382.
 13. Yoshizumi M, Houchi H, Tsuchiya K, Minakuchi K, Horike K, Kitagawa T, Katoh I, Tamaki T. Atrial natriuretic peptide stimulates Na^{+} -dependent Ca^{2+} efflux from freshly isolated adult rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* 1997, 419: 255-258.
 14. Ko W, Zelano JA, Lazzaro R, Lazenby D, Hamilton T, O. Isom OW, Krieger KH. Superiority of the university of wisconsin solution over simple crystalloid for extended heart preservation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1992, 103: 980-992.
 15. Atkinson DE. The energy change of the adenylate pool as a regulatory parameter. Interaction with feedback modifiers. *Biochemistry* 1968, 7: 4030-4034.
 16. Bilzer M, Witthaut R, Paumgartner G, Gerbes AL. Prevention of ischemia/reperfusion injury in the rat liver by atrial natriuretic peptide. *Gastroenterology* 1994, 106: 143-151.
 17. Ambrosio G, Tritto I. Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications. *Am Heart J* 1999, 138: 69-75.
 18. Bethencourt DM, Laks H. Importance of edema and compliance changes during 24 hours of preservation of the dog heart. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1981, 81: 440-449.
 19. Rosenkranz ER, Okamoto F, Buckberg GD, Vinten-Johanson J, Allen BS, Leaf J, Bugyi H, Young H, Barnard RJ. Studies of controlled reperfusion after ischemia. Biochemical studies: Failure of tissue adenosine triphosphate levels to predict recovery of contractile function after controlled reperfusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1986, 92: 488-501.
 20. Jennings RB, Hawkins HK, Lowe JE, Hill ML, Klotman S, Reimer KA. Relation between high energy phosphate and lethal injury in myocardial ischemia in the dog. *Am J Pathol* 1978, 92: 187-207.
 21. Gudbjarnason S, Mathes P, Ravens KG. Functional compartmentation of ATP and creatine phosphate in heart muscle. *J Mol Cell Cardiol* 1970, 1: 325-339.
 22. Kubler W, Katz AM. Mechanism of early "pump" failure of the ischemic heart: possible role of adenosine triphosphate depletion and inorganic phosphate accumulation. *Am J Cardiol* 1977, 40: 467-471.
 23. Hearse DJ, Stewart DA, Chain EB. Recovery from cardiac bypass and elective cardiac arrest. The metabolic consequences of various cardioplegic procedures in the isolated rat heart. *Circ Res* 1974, 35: 448-457.
 24. Meldrum DR, Cleveland JC Jr, Sheridan BC, Rowland RT, Banerjee A, Harken AH. Cardiac surgical implications of calcium dyshomeostasis in the heart. *Ann Thorac Surg* 1996, 61: 1273-1280.
 25. Cole WC, McPherson CD, Sontag D. ATP-regulated K^{+} channels protect the myocardium against ischemia/reperfusion damage. *Circ Res* 1991, 69: 571-581.
 26. Sakuta H, Okamoto K, Tandai M. Atrial natriuretic factor potentiates glibenclamide-sensitive K^{+} currents via the activation of receptor guanylate cyclase in follicle-enclosed *Xenopus* oocytes. *Eur J Pharmacol* 1994, 267: 281-287.
-
- 別刷請求先:
(〒060-8543) 札幌市中央区南1条西16丁目
札幌医科大学医学部外科学第2講座 光島隆二